

21. 가축 구제역 백신생산 유전자 도입한 Birdsfoot trefoil 형질전환 식물체 생산

김기용¹ · 최영진¹ · 성병렬¹ · 최기준¹ · 이상진¹ · 조진기² · 양주성³ · 김종범⁴
(농촌진흥청 축산연구소¹, 경북대학교², 성균관대학교³, 농업생명공학연구원⁴)

Production of Transgenic Birdsfoot trefoil(*Lotus corniculatus* L.) with Vaccine Producing Gene Against 'Foot and Mouth Disease'

K. Y. Kim¹, Y. J. Choi¹, B. R. Sung¹, G. J. Choi¹, S. J. Lee¹, J. Jo², J. S. Yang³ and J. B. Kim⁴
(National Livestock Research Institute, Chonan 331-801, Korea¹,
Kyungpook Natl. Univ., Daegu 702-701, Korea², Sung Kyun Kwan Univ., Suwon 440-746, Korea³,
National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea⁴)

Key words : Transgenic birdsfoot trefoil, Edible vaccine, Foot and mouth disease, New variety.

<목적>

가축 구제역은 소, 돼지, 양, 염소, 사슴 등 발굽이 둘로 갈라진 동물(우제류)에 감염되는 질병으로 전염성이 매우 강하며 입술, 혀, 잇몸, 코, 발굽 사이 등에 물집(수포)이 생기며 체온이 급격히 상승되고 식욕이 저하되어 심하게 앓거나 죽게 되는 질병으로서, 국제수역사무국(OIE)에서 A급 질병(전파력이 빠르고 국제교역상 경제피해가 매우 큰 질병)으로 분류하며, 우리나라에서는 제1종 가축전염병으로 지정되어 있다. 농촌진흥청에서 주관하는 바이오그린21사업의 일환으로 본 연구에서는 가축 구제역을 예방하기 위해, 예방백신을 생산하는 사료작물을 개발하고자 한다. 관련 유전자의 합성 및 형질전환용 발현벡터 개발과 버즈풋 트레포일의 재분화체계 및 형질전환체계는 이미 확립되었으며, 현재는 구제역 백신생산 유전자를 도입한 형질전환체 생산을 수행하고 있다. 이 후 형질전환체의 분석, 백신생산 검정 및 동물실험 등 일련의 연구를 진행할 계획이다.

<재료 및 방법>

○ 공시재료

- 버즈풋 트레포일 (*Lotus corniculatus* L.)

○ 유전자, 발현벡터, *Agrobacterium*

- 구제역 백신생산 유전자 : 3D 및 VP1

- 버즈풋 트레포일 형질전환에 이용한 발현벡터 : pCK-Bar

- *Agrobacterium tumefaciens* strain : EHA105

- 유전자 및 발현벡터 분양 : 성균관대학교 양주성 교수로부터 분양받았음

○ 시험방법

- 1) 버즈풋 트레포일 종자를 소독하여 2,4-D 3 mg/l 를 첨가한 SH-3 배지에서 캘러스를 유도
- 2) 상기의 유전자를 갖는 발현벡터로 *Agrobacterium*을 형질전환 후 전기영동으로 확인
- 3) 형질전환 *Agrobacterium*과 버즈풋 트레포일 캘러스를 공배양하여 유전자 도입
- 4) *Agrobacterium*으로 감염된 캘러스를 hygromycin 및 cefotaxim 첨가배지에서 배양
- 5) 형질전환 캘러스를 선발하여 BOi2Y 배지에서 20~30일 간격으로 계대 배양

- 6) 형질전환 캘러스로부터 shoot 및 root를 유도하여 형질전환된 식물체를 생산.
- 7) PCR, Southern blot 및 northern blot 분석을 실시하여 유전자 도입 및 발현 확인
- 8) 형질전환체의 온실순화, 계통조성, 특성검정 및 포장에서 재배시험 실시

<결과 및 고찰>

- 가축 구제역 백신 유전자(3D 및 VP1)의 두과목초 형질전환 운반체를 제작하여 *Agrobacterium*과 co-cultivation 방법으로 birdsfoot trefoil의 callus에 유전자를 도입하여 shooting 및 rooting 과정을 거쳐 3D 및 VP1 유전자가 도입된 것으로 추정되는 13개체를 획득하였음.
- 한편 미생물 발현 운반체를 제작하여 백신단백질의 대량발현을 유도하고, 이를 분리 정제하여 복합 항체생산을 준비 중이며, 구제역 바이러스 serotypes A, C, Asia 1, SAT1, SAT2, 및 SAT3 의 VP1 유전자의 최적화 설계를 완료하였음.
- 또한 serotypes O형의 VP1, 3D 유전자들의 배양세포 내에서 단백질 발현을 검정하였음(성균관대학교와 공동연구).

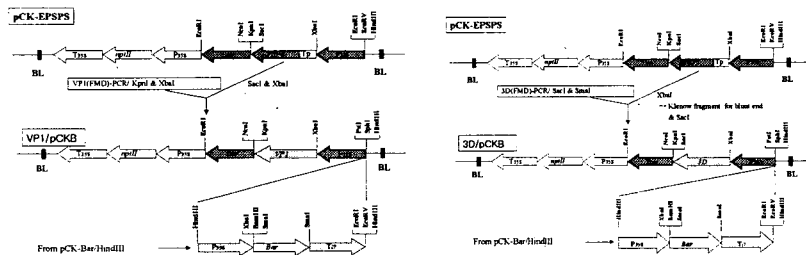


Fig. 1. The strategies of plant transformation vector containing VP1 and 3D genes. pCambia2300 is used as a backbone vector. The VP1 and 3D genes are inserted between 35S promoter and Tnos terminator. For selection of transformed plant, bar gene cassette is introduced.

- 3D 및 VP1 유전자를 도입한 birdsfoot trefoil은 GMO 격리포장에서 계통조성하여 재배 중이며, 이들로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 및 southern blot 분석 방법으로 형질전환 여부를 확인 중에 있음.
- GMO 격리포장 이식 시기 : '05년 3월 중순

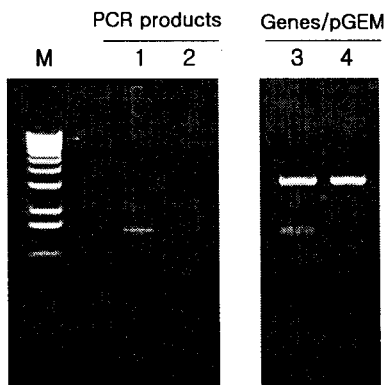


Fig. 2. PCR Cloning of Vaccine Genes (VP1 and 3D) to pGEM. M, Marker DNA; Lane 1, 3D; Lane 2, VP1; Lane 3, 3D; Lane 4, VP1; pGEM size is 3 kb.

- 가축 구제역 백신 유전자 (3D 및 VP1)의 발현백터 제작 및 미생물에서 단백질 발현을 확인하였고, 이들 유전자를 도입한 형질전환 birdsfoot trefoil을 제작하였다. 형질전환 여부가 확인되면 식물체 내에서 단백질 발현을 조사할 예정이다. 이 후 GMO 격리포장에서 형질전환 종자를 생산, 계통의 특성조사 및 계통간 교배를 통해 가축 구제역 백신을 생산하는 품종으로 특허 및 품종출원을 계획하고 있다.